

M/3113-US

3

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 707 011

(21) N° d'enregistrement national :

93 07792

(51) Int Cl⁵ : G 01 N 33/564, 33/543, 33/574

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.06.93.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 30.12.94 Bulletin 94/52.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : Société dite : PASTEUR SANOFI
DIAGNOSTICS — FR.

(72) Inventeur(s) : Briand Jean-Paul, Muller Sylviane et
Murcia de Gilbert.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix.

(54) Procédé immunologique de détection et de dosage d'anticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymé-
rase, application au diagnostic, kit pour la mise en œuvre.

(57) L'invention a pour objet un procédé immunologique de
détection et de dosage d'anticorps dirigés contre la poly
(ADP-ribose) polymérase, caractérisé en ce que l'antigène
mis en œuvre est le peptide constituant le doigt F1 ou le
doigt F2 du zinc de ladite polymérase ou un peptide homo-
logue ou l'un de leurs fragments, présentant une réactivité
immunologique sensiblement identique.

Ce procédé est applicable au diagnostic d'une maladie
autoimmune telle que le lupus érythémateux disséminé et
le syndrome de Gougerot-Sjögren, ainsi qu'au diagnostic
d'états précancéreux ou cancéreux.

L'invention a également pour objet un kit de détection
d'anticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase
comprenant comme antigène le peptide F1 ou F2, un frag-
ment de ceux-ci ou un peptide homologue.

FR 2 707 011 - A1



La présente invention concerne un procédé d'immunodiagnostic de maladies autoimmunes systémiques et d'états cancéreux qui repose sur la recherche dans le sérum des malades d'anticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase.

On sait que cette enzyme catalyse l'ADP-ribosylation de protéines du noyau cellulaire, réaction associée à un certain nombre de fonctions régulatrices telles que la réparation de l'ADN, l'expression des gènes et la différenciation cellulaire. Sa séquence d'acides aminés a été décrite dans Biochem. Biophys. Res. Commun. 148 617-622(1987); la formation de poly(ADP-ribose) est augmentée notamment en cas de dommage dans l'ADN, de choc thermique et d'inflammation et la présence d'anticorps dirigés contre le poly(ADP-ribose) dans le sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé a été décrite dès 1977 puis ultérieurement chez certains patients ayant un syndrome de Gougerot-Sjögren, une polyarthrite rhumatoïde, une sclérodermie ou encore chez d'autres patients souffrant d'une maladie infectieuse comme la tuberculose, la lèpre ou bien étant infectés par E. Coli ou Klebsiella.

Plus récemment, la présence d'autoanticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase a été recherchée dans le sérum de diverses personnes atteintes de maladies autoimmunes mais les résultats mentionnés par Yamanaka et col. dans J. Clin. Invest. 80 900-904 (1987) et 83 180-186 (1989) puis par Negri et col. dans Autoimmunity 6 203-209 (1990) sont contradictoires, le premier ne trouvant des anticorps que dans une faible proportion de maladies rhumatismales, tandis que le second les trouve dans plusieurs types de maladies autoimmunes, mais probablement à cause d'un artefact expérimental.

On a maintenant trouvé qu'il était possible de diagnostiquer un lupus érythémateux disséminé ou un syndrome de Gougerot-Sjögren en recherchant dans le sérum des malades la présence d'anticorps dirigés contre une région particulière de l'enzyme poly(ADP-ribose)polymérase. On sait néanmoins que la concentration sérique de ces anticorps varie avec les phases de ces maladies, et d'autres moyens seront nécessaires dans certains cas pour les diagnostiquer; la recherche d'anticorps dirigés contre le polymère lui-même, le poly(ADP-ribose), est l'un des moyens déjà utilisé, mais il n'est pas très spécifique et révèle aussi d'autres maladies autoimmunes.

La présente invention concerne un procédé immunologique de détection et de dosage d'anticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'antigène mis en oeuvre est le peptide formant les doigts de zinc F1 ou F2 de ladite poly(ADP-ribose) polymérase, des fragments de ceux-ci ou des peptides homologues.

Les peptides sont représentés à la Fig. annexée, F1 étant SEQ ID N° 1 et F2 étant SEQ ID N° 2, et comprennent respectivement les séquences d'acides aminés situées entre les positions 21 à 56 et 125 à 162 de l'enzyme.

Par peptides homologues, on entend des peptides dans lesquels certains acides aminés ont été remplacés par des acides aminés équivalents, et qui présentent une réactivité immunologique sensiblement identique à celle des peptides constituant les doigts F1 ou F2 ou des fragments de ceux-ci.

Comme acides aminés équivalents, on peut citer lysine et arginine, glycine et alanine, acide aspartique et acide glutamique, asparagine et glutamine.

Ces peptides peuvent être obtenus par clonage ou par synthèse chimique, par exemple par la méthode en

phase solide de Merrieffield.

Les autoanticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase sont généralement présents dans le sérum des malades atteints de maladies autoimmunes systémiques telles que le lupus érythémateux disséminé ou les syndromes de Gougerot-Sjögren primaire ou secondaire, mais on pense les trouver aussi dans les états précancéreux et cancéreux puisqu'il existe une corrélation entre l'inhibition de l'enzyme et la transformation maligne des cellules, comme cela a été décrit par T. Boulikas dans Anticancer Research 12 : 885-898 (1992).

La présente invention concerne donc aussi les procédés d'immunodiagnostic du lupus érythémateux disséminé, du syndrome de Gougerot-Sjögren ou de certains états précancéreux ou cancéreux qui consistent à effectuer la recherche d'anticorps dans le sérum des patients à l'aide d'un peptide choisi parmi les doigts F1 ou F2 de la poly(ADP-ribose) polymérase, leurs fragments et leurs homologues à l'aide d'un immuno-essai.

Par immuno-essai ou procédé de détection immunologique, on entend tous les procédés bien connus de l'homme du métier, qui consistent à mettre en présence un échantillon du liquide biologique, en général du sérum, dans lequel on veut rechercher les anticorps avec une certaine quantité de l'antigène caractéristique choisi, à séparer l'antigène n'ayant pas réagi et à révéler le complexe immunologique éventuellement formé. L'antigène peut être immobilisé sur une phase solide, telle que les cupules d'une microplaque de titration ou des microbilles de polymère, par adsorption ou par couplage chimique; l'anticorps fixé peut alors être révélé par la formation d'un complexe avec un anti-anticorps, qui a été préalablement marqué de façon classique dans ce domaine par une enzyme, dont la présence sur la phase solide se traduira par la conver-

sion de son substrat, lors de son introduction dans le milieu, en un produit coloré, fluorescent ou luminescent; l'anti-anticorps peut aussi être radiomarqué.

5 D'autres méthodes plus ou moins complexes sont connues et décrites notamment dans l'ouvrage "Laboratory Technics in Biochemistry and Molecular Biology", vol. 19, edited by R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg - Elsevier (1988), auquel l'homme du métier pourra se référer.

10 La présente invention a également pour objet un kit de détection d'anticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide antigénique choisi parmi les doigts F1 et F2 de ladite polymérase, un peptide homologue ou
15 l'un de leurs fragments présentant une réactivité immunologique sensiblement identique, éventuellement immobilisé sur un support solide, et éventuellement un anticorps marqué apte à se fixer au complexe anticorps-antigène formé, et des moyens de mise en évidence de la
20 fixation dudit anticorps audit complexe.

Dans ce qui suit, on décrit les résultats de l'étude des sérums de 235 sujets connus présentant diverses maladies autoimmunes et de 42 volontaires sains, par le procédé de l'invention avec une méthode immuno-
25 enzymatique sur phase solide dite ELISA.

97 malades avaient un lupus érythémateux disséminé en phase active ou non (LED), 67 avaient un syndrome de Gougerot-Sjögren primaire (pSS) et 16 un syndrome secondaire associé à un lupus (sSS) tandis que
30 38 avaient une polyarthrite juvénile (JCA) et 17 une connectivité mixte (MCTD).

On a immobilisé dans les puits d'une plaque de microtitration le peptide F2 (Fig.) synthétisé par la méthode de Merrieffield ou à titre comparatif l'enzyme
35 poly(ADP-ribose) polymérase recombinante humaine décrite

dans Gene 114 279-283 (1992) ainsi que l'enzyme de veau de structure analogue, par adsorption de façon classique à 37° C à partir de leurs solutions dans un tampon carbonate (0,05 M, pH 9,6), à raison de 100 ng/ml pour les enzymes et 1 µM pour le peptide.

Du poly(ADP-ribose) de 90 ± 10 unités avec une densité de ramification de 2 ± 0,5 %, préparé comme décrit dans Biochem. Cell. Biol. 65 668-673 (1987) a aussi été immobilisé à partir d'une solution dans un tampon phosphate salin Tween® de 50 ng/ml, par la méthode citée dans Clin. Exp. Immunol. 86 124-133 (1991).

Les sérums testés ont été dilués au 1/1000 et la révélation a été effectuée par addition d'anti-IgG humaine conjugué à de la peroxydase de radis noir, en utilisant comme substrat la tétraméthylbenzidine en présence de H₂O₂.

Les sérums ont été déclarés positifs lorsque la densité optique mesurée était supérieure à une valeur définie à l'aide de sérums normaux, étant entendu que la densité optique de moins de 2,5 % de ces sérums normaux pouvait être supérieure à cette valeur.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous. L'enzyme entière recombinante ne donne pas de réaction décelable dans les conditions classiques choisies; par contre le poly(ADP-ribose) donne des résultats intéressants, comme l'avaient souligné d'autres auteurs.

Le peptide F2 donne un résultat inattendu, lorsque l'on se réfère à celui obtenu avec l'enzyme entière, recombinante humaine ou naturelle de veau, d'autant plus que très peu de sérums ont été trouvés positifs avec l'enzyme et négatifs avec le peptide.

TABLEAU

5

10

15

20

25

30

35

		Sujets positifs					
Maladie	Nb sujets	avec Poly(ADP-ribose)		avec Enzyme entière		avec Peptide F2	
LED	n=97	41	(42,3%)	5	(5,2%)	34	(35,1%)
pSS	n=67	14	(20,9%)	6	(9,0%)	28	(41,8%)
sSS	n=16	7	(43,8%)	2	(12,5%)	9	(56,3%)
JCA	n=38	1	(2,6%)	1	(2,6%)	0	(0%)
MCTD	n=17	2	(11,8%)	1	(5,9%)	1	(5,9%)
normal	n=42	1	(2,4%)	0	(0%)	1	(2,4%)

REVENDECATIONS

1. Procédé immunologique de détection et de dosage d'anticorps dirigés contre la poly (ADP-ribose) polymérase dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'antigène mis en oeuvre est le peptide constituant le doigt F1 ou le doigt F2 du zinc de ladite polymérase ou un peptide homologue ou l'un de leurs fragments, présentant une réactivité immunologique sensiblement identique.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'antigène est le doigt F2 du zinc de ladite polymérase.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'échantillon biologique à étudier est mis en contact avec l'antigène immobilisé et que le complexe immunologique est révélé avec un anticorps marqué par une enzyme.

4. Procédé de diagnostic d'une maladie autoimmune choisie parmi le lupus érythémateux disséminé et le syndrome de Gougerot-Sjögren, caractérisé en ce qu'on effectue la recherche d'anticorps sériques dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase par un procédé selon l'une des revendications 1 à 3.

5. Procédé de diagnostic d'un état précancéreux ou cancéreux, caractérisé en ce qu'on effectue la recherche d'anticorps sériques dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase par un procédé selon l'une des revendications 1 à 3.

6. Kit de détection d'anticorps dirigés contre la poly(ADP-ribose) polymérase, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide antigénique choisi parmi les doigts F1 et F2 de ladite polymérase ou un peptide homologue ou l'un de leurs fragments, présentant une réactivité immunologique sensiblement identique, éven-

tuellement immobilisé sur un support solide, et éventuellement un anticorps marqué apté à se fixer au complexe anticorps-antigène formé, et des moyens de mise en évidence de la fixation dudit anticorps audit complexe.

1/1

SEQ ID N° : 1

Cys Lys Lys Cys Ser Glu Ser Ile Pro Lys Asp Ser Leu Arg Met Ala
1 5 10 15
Ile Met Val Gln Ser Pro Met Phe Asp Gly Lys Val Pro His Trp Tyr
20 25 30
His Phe Ser Cys
35

SEQ ID N° : 2

Cys Lys Gly Cys Met Glu Lys Ile Glu Lys Gly Gln Val Arg Leu Ser
1 5 10 15
Lys Lys Met Val Asp Pro Glu Lys Pro Gln Leu Gly Met Ile Asp Arg
20 25 30
Trp Tyr His Pro Gly Cys
35

Fig. unique.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 487869
FR 9307792

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,Y	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol.83, Janvier 1989, NEW YORK, NY pages 180 - 186 YAMANAKA ET AL. 'Human autoantibodies to poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase' * le document en entier *	1-6
D,Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol.148, no.2, 29 Octobre 1987, NEW YORK NY pages 617 - 622 UCHIDA ET AL. 'Nucleotide sequence of a full-length' * page 620, ligne 18 - ligne 22; figure 1 *	1-6
A	WO-A-91 18920 (NEOSYSTEM S.A.) * abrégé; exemple 2 *	1,3,4,6
D,A	AUTOIMMUNITY, vol.6, 1990, LONDON pages 203 - 209 NEGRI ET AL. 'Autoantibodies to poly(adp-ribose)polymerase in autoimmune disease' * page 204 *	1,3-6
D,A	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol.80, no.3, Septembre 1987, NEW YORK, NY pages 900 - 904 YAMANAKA ET AL. 'Human autoantibodies to poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase' * abrégé * * page 901, colonne de droite - page 902, colonne de gauche; tableau 1 *	1,3-5

DOMAINES TECHNIQUES
RECHERCHES (Int.Cl.5)

G01N

-/--

1

EPO FORM 1503 01.82 (P/MC13)

Date d'achèvement de la recherche

9 Mars 1994

Examinateur

Ceder, 0

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un
autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication
ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date
de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 487869
FR 9307792

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	<p>ANTICANCER RESEARCH, vol.12, 1992, ATHENS pages 885 - 898 BOULIKAS 'Poly(ADP-ribose) synthesis in blocked' * page 891, colonne de droite * * page 895 *</p> <p>---</p>	5
A	<p>FR-A-2 682 113 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) -----</p>	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
9 Mars 1994		Ceder, 0
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		